

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-215876

(43)Date of publication of application : 18.08.1998

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C12N 1/21

C12N 5/10

C12N 9/00

(21)Application number : 09-024887

(71)Applicant : SANKYO CO LTD

(22)Date of filing : 07.02.1997

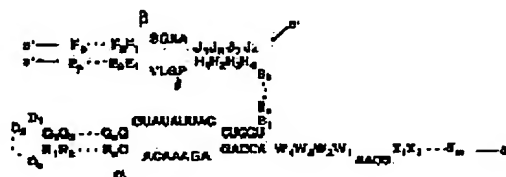
(72)Inventor : OTSUKA EIKO
KOMATSU YASUO

(54) SELF-TRIMMING TYPE HAIRPIN RIBOZYME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the new subject ribozyme comprising complex of polyribonucleotides containing nucleotide sequences \square and \square having specific structures, having self-trimming activities and ribozyme activities and not allowing unrequired RNA to add to the 3' terminal thereof.

SOLUTION: The subject ribozyme is a new ribozyme comprising a complex of polyribonucleotides containing nucleotide sequences \square and \square of the formula [U is uracil nucleotide; C is cytosine nucleotide; A is adenine nucleotide; G is guanine nucleotide; B1 to Bh, D1 to De, E1 to Ep, H1 to H4, Q1 to Qn, W1 to W4, X1 to Xm and P are each U, C, A or G; F1 to Fp, J1 to J4 and R1 to Rn are each nucleotide complementary to E1 to Ep, H1 to H4 and Q1 to Qn respectively; S is A or C; L is U, A or C; V is A when S is C, and U when S is A; (h) is 3-20; (e), (m), (n) and (p) are each 1-10; J1 to J4 do not have three or more successive same nucleotide sequences between W1 to W4, and F1 to Fp do not have three or more successive same nucleotide sequences between X1 to Xm].



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-215876

(43) 公開日 平成10年(1998) 8月18日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
1/21		1/21	
5/10		9/00	
9/00		5/00	A
審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 26 頁)			
(21) 出願番号	特願平9-24887	(71) 出願人	000001856 三共株式会社 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号
(22) 出願日	平成9年(1997) 2月7日	(72) 発明者	大塚 栄子 北海道札幌市中央区南10条西18-1-3-614
		(72) 発明者	小松 康雄 北海道札幌市北区北11条西3丁目15番地 ノースタウンハウス1123号室
		(74) 代理人	弁理士 大野 彰夫 (外2名)

(54) 【発明の名称】 自己トリミング型ヘアピンリボザイム

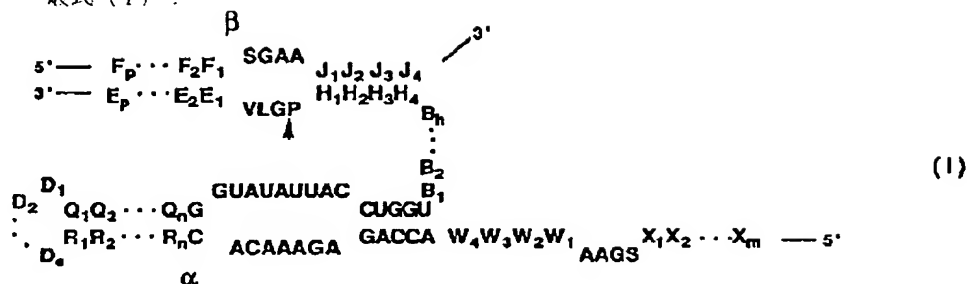
(57) 【要約】

【課題】 DNAから転写されたリボザイムの3'末端に不要なRNAが付加しない、新規リボザイムを提供する。

【解決手段】 新規な構造を有するリボザイムを構成するポリリボヌクレオチドに転写されるDNAを調製し、該DNAから転写されたポリリボヌクレオチドが自己トリミングにより3'末端の不要部分を切断し、高い切断活性を有するリボザイムとなることを見出した。本発明のリボザイムを直接生体内に投与することにより、あるいは、これをコードするDNAを好適なベクターに組込み生体内に投与することにより、生体に悪影響をもたらす天然のポリリボヌクレオチドまたはRNAを特異的に切断することが可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1)：



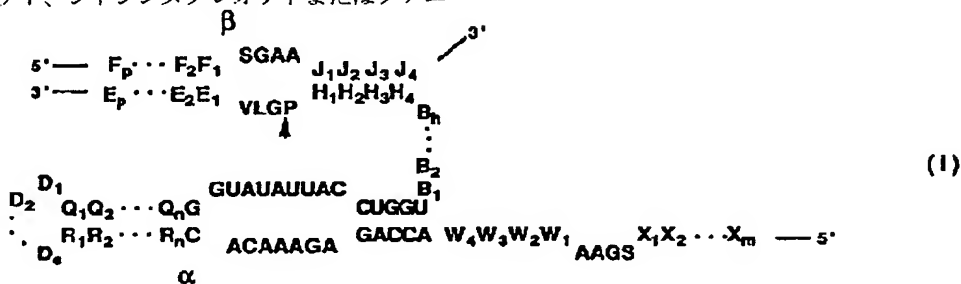
で示されるヌクレオチド配列 α および β を含むことからなるポリリボヌクレオチドの複合体。(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_h$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $D_1 \sim D_e$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $E_1 \sim E_p$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $F_1 \sim F_p$ は $E_1 \sim E_p$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $H_1 \sim H_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $J_1 \sim J_4$ は $H_1 \sim H_4$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、hは3~20の整数を表し、e、m、n、pは同一または異なって1~10の整数を表し、 $J_1 \sim J_4$ からなるヌクレオチド配列は、 $W_1 \sim W_4$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列であり、 $F_1 \sim F_p$ からなるヌクレオチド配列は、 $X_1 \sim X_m$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列である。)

ンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、hは3~20の整数を表し、e、m、n、pは同一または異なって1~10の整数を表し、 $J_1 \sim J_4$ からなるヌクレオチド配列は、 $W_1 \sim W_4$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列であり、 $F_1 \sim F_p$ からなるヌクレオチド配列は、 $X_1 \sim X_m$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列である。)

【請求項2】 一般式(1)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが3~8であり、m、n、pが同一または異なって3~10である、請求項1記載の複合体。

【請求項3】 一般式(1)：

【化2】



に示されるヌクレオチド配列 β を含むことからなり、ヌクレオチド配列 α を含むことからなるポリリボヌクレオチドを式中の矢印の部位において切断する活性を有するポリリボヌクレオチド。(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレ

オチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_h$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $D_1 \sim D_e$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチ

10



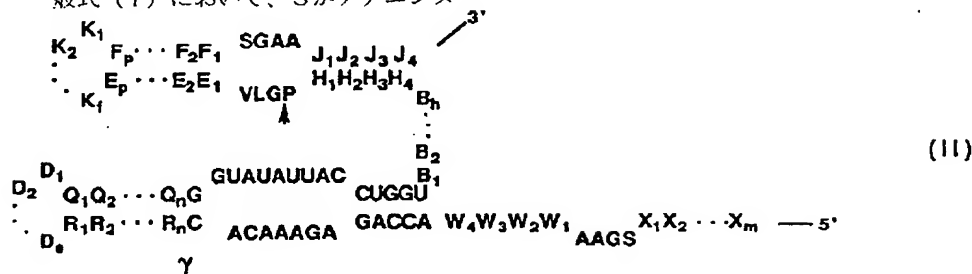
30

【化3】

ドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 P はウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 L はウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 V は、 S がシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、 S がアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 h は $3 \sim 20$ の整数を表し、 e, m, n, p は同一または異なって $1 \sim 10$ の整数を表し、 $J_1 \sim J_4$ からなるヌクレオチ

ド配列は、 $W_1 \sim W_4$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列であり、 $F_1 \sim F_p$ からなるヌクレオチド配列は、 $X_1 \sim X_m$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列である。）

【請求項6】 一般式 (I) において、Sがアデニンヌ



で示されるヌクレオチド配列 γ を含むことからなるポリリボヌクレオチド。(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_h$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $D_1 \sim D_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $E_1 \sim E_p$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $F_1 \sim F_p$ は $E_1 \sim E_p$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $H_1 \sim H_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $J_1 \sim J_4$ は $H_1 \sim H_4$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $K_1 \sim K_e$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_4$ は同一または異なってウ

クレオチドであり、hが3～8であり、m、n、pが同一または異なって3～10であることを特徴とする、請求項5記載のポリリボヌクレオチド。

【請求項7】 分子中に、一般式 (II) :

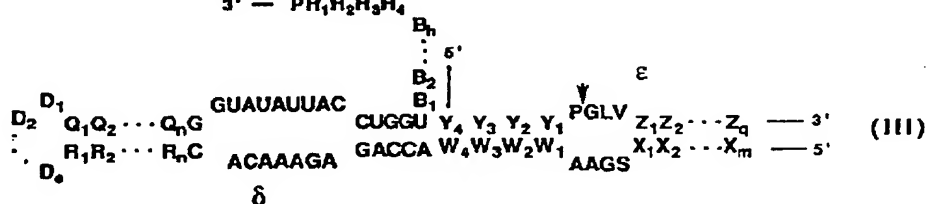
【化4】

ラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、hは3～20の整数を表し、e、f、m、n、pは同一または異なって1～10の整数を表し、 $J_1 \sim J_4$ からなるヌクレオチド配列は、 $W_1 \sim W_4$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列であり、 $F_1 \sim F_p$ からなるヌクレオチド配列は、 $X_1 \sim X_m$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列である。）

【請求項8】 一般式 (II) において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが3～8であり、m、n、pが同一または異なって3～10である、請求項7記載のポリリボヌクレオチド。

【請求項9】 下記の一般式 (III) :

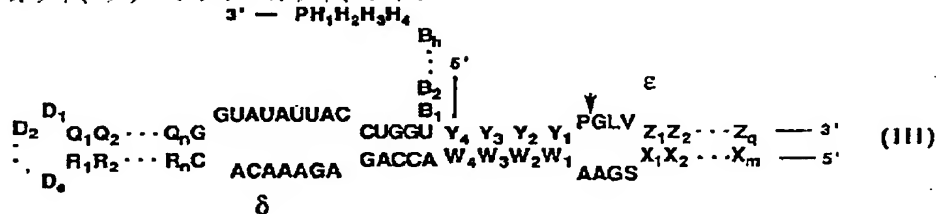
【化5】



に示されるヌクレオチド配列 δ を含むことからなるポリリボヌクレオチド。(式中、Uはウラシルヌクレオチ

ド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_h$ は

同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $D_1 \sim D_6$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $H_1 \sim H_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 S はアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシ



に示されるヌクレオチド配列 δ を含むことからなるポリリボヌクレオチドを用いて、ヌクレオチド配列 ϵ を含むことからなるポリリボヌクレオチドを式中の矢印の部位において切断する方法。(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $D_1 \sim D_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $H_1 \sim H_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 S はアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 P はウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 L はウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレ

ヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、X₁ ~ X_n は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、hは3 ~ 20の整数を表し、e、m、nは同一または異なって1 ~ 10の整数を表す。）

【請求項10】 一般式(III)において、Sがアデニンスクレオチドであり、hが3～8であり、m、nが同一または異なって3～10である、請求項9記載のポリリボヌクレオチド。

【請求項 1.1】 一般式 (I I I) :

【化6】

オチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 V は、 S がシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、 S がアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Y_1 \sim Y_3$ は $W_1 \sim W_3$ にハイブリダイズしうるヌクレオチドを表し、 $Z_1 \sim Z_q$ は $X_1 \sim X_n$ にハイブリダイズしうるヌクレオチドを表し、 h は $3 \sim 20$ の整数を表し、 e, m, n, q は同一または異なつて $1 \sim 10$ の整数を表す。))

【請求項12】 一般式(III)において、Sがアデニンスクレオチドであり、hが3～8であり、m、nが同一または異なって3～10である、請求項1記載の方法。

【請求項 13】 請求項 3 乃至 10 のいずれかに記載のポリリボヌクレオチドに転写されるヌクレオチド配列を有する DNA。

【請求項 14】 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなる、請求項 13 記載の DN A。

【請求項15】 請求項13または14記載のDNAを含む組換えベクター。

【請求項16】 請求項15記載の組換えベクターを保持する細胞。

【発明の詳細な説明】

[0 0 0 1.]

【発明の属する技術分野】本発明は、自己トリミング活性および基質ポリリボヌクレオチドを切断するリボザイム活性を有するポリリボヌクレオチド、該ポリリボヌク

レオチドをコードするDNA、該DNAを含む組換えベクター、該組換えベクターを保持する細胞、および該リボザイム活性を有するポリリボヌクレオチドによる基質ポリリボヌクレオチドの特定部位の切断方法に関する。

【0002】

【従来の技術】タバコリングススポットウイルスのサテライトRNAのプラス鎖や、アボガドサンドウィッチウィロイドのプラス鎖RNAやマイナス鎖RNAは、 Mg^{2+} の存在下で自己の触媒活性により切断されることが見出されている [Prody, G. A., et al. (1986) *Science* **231**, 1577-1580 および Hutchins, C. J., et al. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**, 3627-3640 参照]。これらのRNAの切断部位周辺のヌクレオチド配列は共通性を有しており、この共通性よりこれらRNAの三次構造が予想された。ウーレンベックは、これらの共通配列を基に19merの短鎖RNAフラグメントを設計し、該フラグメントが24merのRNAを触媒的に切断することを示した [Uhlenbeck, O. C. (1987) *Nature* **328**, 596-600 参照]。

【0003】また、ウィロイドやウイルスのサテライトRNAだけでなく、イモリのサテライトDNAの転写物もこのリボザイムのヌクレオチド配列を有することが報告されている [Epstein, L. M. and Gall, J. G. (1987) *Cell*, **48**, 535-543 参照]。このイモリのサテライトDNAの転写物の切断部位周辺のヌクレオチド配列を有する2種類の21mer RNAを化学合成し、この一方のRNAに他方を加えると、天然と同一の部位で切断反応が起こることが見出されている [Koizumi, M., et al. (1988) *FEBS Lett.* **228**, 228-230 参照]。さらに、この結果を基に、リボザイムを用いて他のRNAまたはポリリボヌクレオチド分子を切断する方法が開発されている [Koizumi, M., et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 7059-7071 参照]。

【0004】一方、タバコリングススポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖も切断反応を起こし、特定部位において切断を引き起こすことが明らかにされた

[Buzayan, J. M., et al. (1986) *Nature* **323**, 349-353 参照]。また、この切断に必要なRNAの最小領域が明らかにされた [Hempel, A. and Tritz, R. (1989) *Biochemistry*, **28**, 4929-4933 参照]。この触媒活性を持つRNAは50ヌクレオチドからなり、このRNA内にヘアピンループ構造を有するモデルが提唱され、ヘアピン型リボザイムと名付けられた。このヘアピン型リボザイムのヌクレオチドを他のヌクレオチドに変換することによって、切断反応に重要ないくつかのヌクレオチドが明らかにされている [Chowrira, B. M., et al. (1991) *Nature* **354**, 320-322 および Sekiguchi, A., et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 6833-6838 参照]。また、パークらのグループは、ランダムな塩基配列をもつDNAとPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法を用いたイ

ンビトロ選択 (in vitro selection) 法によってヘアピン型リボザイムの切断反応と連結反応に重要なヌクレオチド配列を明らかにしている [Berzal-Herranz, A., et al. (1992) *Gene & Development* **6**, 129-134 参照]。また、ヘアピンループ部分を欠失したRNAでも触媒反応が進行することも明らかにされている [Sekiguchi, A., et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 6833-6838 参照]。

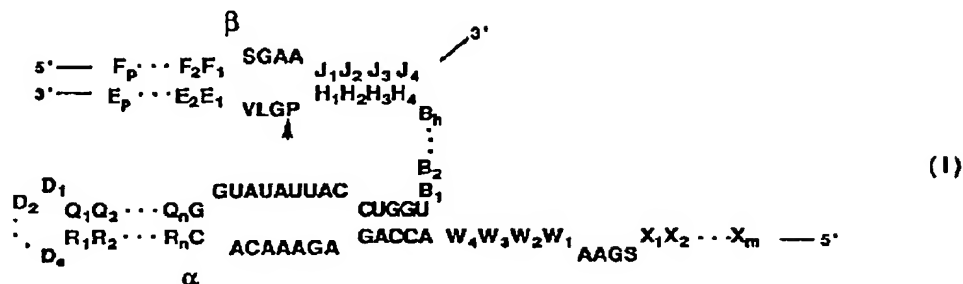
【0005】さらに、小松らは、プロバンジオール・ホスフェートを1回から13回繰り返したリンカーを介して、基質の5'末端の水酸基と、2本鎖からなるヘアピン型リボザイムのうちの短い鎖の3'末端の水酸基を結合したRNAを合成した。これらのRNAの切断活性を調べると、プロバンジオールホスフェートを7回以上繰り返して、基質とリボザイムの1本の鎖を結合したものに天然型を上回る活性があることを示した。このことは、ヘアピン型リボザイムの4つのヘリックスのうち、2番目のヘリックスと3番目ヘリックスとの間で折れ曲がった構造を有していることを示している [Komatsu, Y., et al. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3602 参照]。大塚らは、ここで示されたヘアピン型リボザイムの折れ曲がった高次構造を保持したままで、ヘアピン型リボザイムのドメインの結合位置を変換すること (触媒活性ドメインと基質結合ドメインを多量体のポリリボヌクレオチドを介してヘリックス1とヘリックス4の位置で結合したもの) を試みたところ、ドメインの結合位置を変換しても、ポリリボヌクレオチドがなお高いリボザイム活性を有していることを見出している [特開平8-131163号参照]。

【0006】一方、リボザイムを細胞内で人工的に発現させることにより、疾患に関与するRNAを切断する試みがなされている [例えば Bratty, J., et al. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1216**, 345-359 参照]。その場合、リボザイムをコードするDNAとして投与したり、レトロウイルスベクターを用いる方法がとられる。いずれの方法においても、リボザイムの遺伝子を哺乳動物のプロモーターの支配下で発現させるシステムが用いられるが、転写されたリボザイムは、その3'末端に、リボザイムの活性と関係しない余分なRNAが付加された形となる。この3'末端の余分な部分は、リボザイム活性を有する部位との間で塩基対を形成することにより、リボザイム活性を低下させる可能性がある。

【0007】そこで、疾患に関与するRNAを切断するリボザイムの両端に、自らを切断することにより末端を整える (以下「トリミング」という) ための別のリボザイムを配置した遺伝子を用いる方法が報告されている [大川 淳、多比良 和誠 (1995) *蛋白質・核酸・酵素* **40**, 1421-1429 参照]。しかしながら、この場合、長いトリミング用リボザイム配列を調製する必要があり、またトリミング後もなお余分な部分が残る。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、DNAから転写されたリボザイムの3'末端に不要なRNAが付加しない新規リボザイム、および該リボザイムを用いたポリリボヌクレオチドの切断方法を提供することを目的とする。



【0011】で示されるヌクレオチド配列 α および β を含むことからなるポリリボヌクレオチドの複合体、(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_h$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $D_1 \sim D_e$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $E_1 \sim E_p$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $F_1 \sim F_p$ は $E_1 \sim E_p$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $H_1 \sim H_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $J_1 \sim J_4$ は $H_1 \sim H_4$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドま

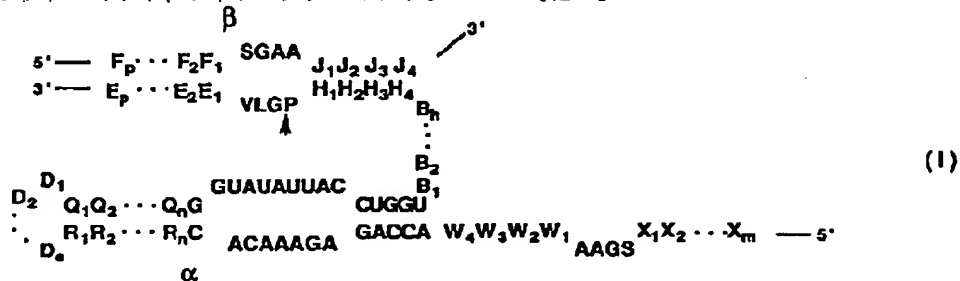
たはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、hは3~20の整数を表し、e、m、n、pは同一または異なって1~10の整数を表し、 $J_1 \sim J_4$ からなるヌクレオチド配列は、 $W_1 \sim W_4$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列であり、 $F_1 \sim F_p$ からなるヌクレオチド配列は、 $X_1 \sim X_n$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列である。)

(2) 一般式(I)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが3~8であり、m、n、pが同一または異なって3~10である、(1)記載の複合体、

(3) 一般式(I)：

【0012】

【化8】



【0013】に示されるヌクレオチド配列 β を含むこと 50 からなり、ヌクレオチド配列 α を含むことからなるポリ

リボヌクレオチドを式中の矢印の部位において切断する活性を有するポリリボヌクレオチド、(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、B₁ ~ B₆ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、D₁ ~ D₆ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、E₁ ~ E₆ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、F₁ ~ F₆ はE₁ ~ E₆ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、H₁ ~ H₄ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、J₁ ~ J₄ はH₁ ~ H₄ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Q₁ ~ Q₆ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、R₁ ~ R₆ はQ₁ ~ Q₆ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、W₁ ~ W₄ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、X₁ ~ X₄ はW₁ ~ W₄ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Y₁ ~ Y₄ はX₁ ~ X₄ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Z₁ ~ Z₄ はY₁ ~ Y₄ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表す)

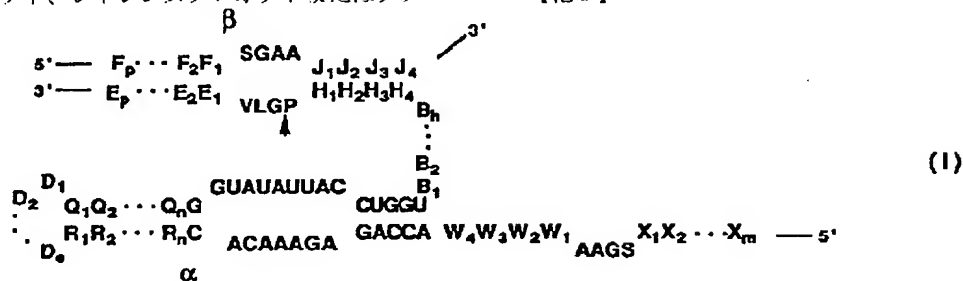
ヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 P はウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 L はウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 V は、 S がシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、 S がアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 h は $3 \sim 20$ の整数を表し、 e, m, n, p は同一または異なって $1 \sim 10$ の整数を表し、 $J_1 \sim J_4$ からなるヌクレオチド配列は、 $W_1 \sim W_4$ からなるヌクレオチド配列との間に 3 以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列であり、 $F_1 \sim F_6$ からなるヌクレオチド配列は、 $X_1 \sim X_n$ からなるヌクレオチド配列との間に 3 以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列である。）

(4) 一般式 (I) において、S がアデニンヌクレオチドであり、h が 3~8 であり、m、n、p が同一または異なって 3~10 であることを特徴とする、(3) 記載のポリリボヌクレオチド、

(5) 一般式 (I) :

【0014】

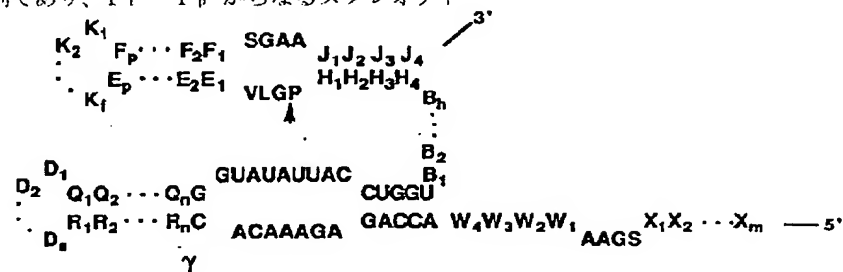
【化9】



【0015】に示されるヌクレオチド配列 α を含むことからなり、ヌクレオチド配列 β を含むことからなるポリリボヌクレオチドにより式中の矢印の部位において切断されることを特徴とするポリリボヌクレオチド、(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、B₁ ~ B_nは同一または異なつてウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、D₁ ~ D_eは同一または異なつてウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、E₁ ~ E_pは同一または異なつてウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、F₁ ~ F_pはE₁ ~ E_pにそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、H₁ ~ H_q

は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $J_1 \sim J_4$ は $H_1 \sim H_4$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 S はアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 P はウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドま

たはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、hは3～20の整数を表し、e、m、n、pは同一または異なって1～10の整数を表し、 $J_1 \sim J_4$ からなるヌクレオチド配列は、 $W_1 \sim W_4$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列であり、 $F_1 \sim F_p$ からなるヌクレオチド



(II)

【0017】で示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリリボヌクレオチド、(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $D_1 \sim D_e$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $E_1 \sim E_p$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $F_1 \sim F_p$ は $E_1 \sim E_p$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $H_1 \sim H_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $J_1 \sim J_4$ は $H_1 \sim H_4$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、Sはアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $K_1 \sim K_r$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シ

トシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、hは3～20の整数を表し、e、f、m、n、pは同一または異なって1～10の整数を表し、 $J_1 \sim J_4$ からなるヌクレオチド配列は、 $W_1 \sim W_4$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列であり、 $F_1 \sim F_p$ からなるヌクレオチド配列は、 $X_1 \sim X_m$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列である。) (8) 一般式(II)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが3～8であり、m、n、pが同一または異なって3～10である、(7)記載のポリリボヌクレオチド。

(7) 分子中に、一般式(III)：

【0016】

【化10】

トシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、hは3～20の整数を表し、e、f、m、n、pは同一または異なって1～10の整数を表し、 $J_1 \sim J_4$ からなるヌクレオチド配列は、 $W_1 \sim W_4$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列であり、 $F_1 \sim F_p$ からなるヌクレオチド配列は、 $X_1 \sim X_m$ からなるヌクレオチド配列との間に3以上連続した同一のヌクレオチド配列を有さない配列である。) (8) 一般式(II)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが3～8であり、m、n、pが同一または異なって3～10である、(7)記載のポリリボヌクレオチド。

(8) 一般式(II)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが3～8であり、m、n、pが同一または異なって3～10である、(7)記載のポリリボヌクレオチド。

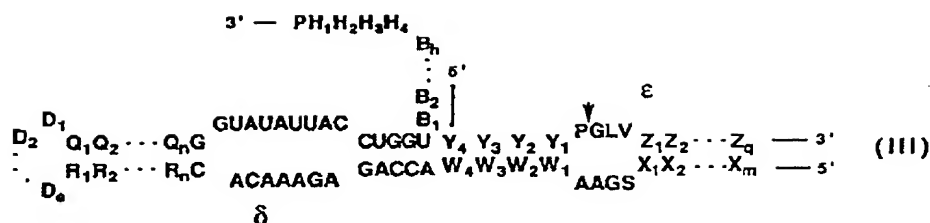
【0018】(9) 下記的一般式(III)：

【0019】

【化11】

17

18



【0020】に示されるヌクレオチド配列 δ を含むことからなるポリリボヌクレオチド、(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_h$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $D_1 \sim D_e$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $H_1 \sim H_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Sはアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそれぞれ

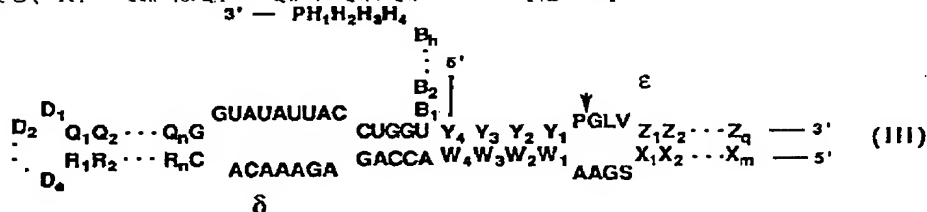
相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、hは3～20の整数を表し、e、m、nは同一または異なって1～10の整数を表す。)

(10) 一般式(III)において、Sがアデニンヌクレオチドであり、hが3～8であり、m、nが同一または異なって3～10である、(9)記載のポリリボヌクレオチド、

(11) 一般式(III)：

【0021】

【化12】

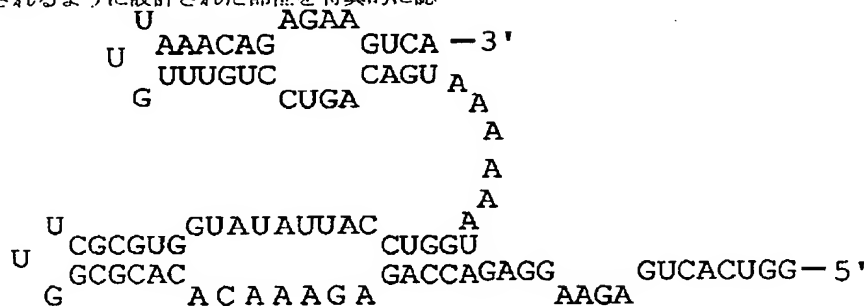


【0022】に示されるヌクレオチド配列 δ を含むことからなるポリリボヌクレオチドを用いて、ヌクレオチド配列 ϵ を含むことからなるポリリボヌクレオチドを式中の矢印の部位において切断する方法、(式中、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、 $B_1 \sim B_h$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $D_1 \sim D_e$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $H_1 \sim H_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Sはアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Q_1 \sim Q_n$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $R_1 \sim R_n$ は $Q_1 \sim Q_n$ にそ

れぞれ相補的なヌクレオチドを表し、 $W_1 \sim W_4$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、 $X_1 \sim X_m$ は同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、 $Y_1 \sim Y_4$ は $W_1 \sim W_4$ にハイブリダイズしうるヌクレオチドを表し、 $Z_1 \sim Z_q$ は $X_1 \sim X_m$ にハイブリダイズしうるヌクレオチドを表し、hは3～20の整数を表し、e、m、n、qは同一または異なって1～10の整数を表す。)

(12) 一般式(III)において、Sがアデニンヌ

【0026】本発明の自己トリミング型リボザイムには、上記式(1)に示される α および β からなる複合体も包含される。上記式(1)において、自己トリミングによって切断されるように設計された部位を特異的に認



鎖反応 (PCR) [Saiki, R. K., et al (1988) Science **239**, 487-491 参照] 等の DNA ポリメラーゼ反応を利用して、それら部分オリゴデオキシリボヌクレオチドを連結することにより作製することができる。オリゴデオキシリボヌクレオチドは、5'-水酸基をジメトキシトリチル基、塩基部のアミノ基をアシル基で保護した、

ヌクレオシド3'-O-ホスホロアミダイト体（パーキンエルマー社、ファルマシア社、グレンリサーチ社、またはパーセプティブ社より購入可能）を原料として、DNA/RNA自動合成機（例えば（株）パーキンエルマー・ジャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製）を用いることにより所望の配列のものを合成することができる [Koster, et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 4539 参照]。

【0033】合成終了後、リン酸基の保護基のβ-シアノエチル基の除去、ポリヌクレオチド鎖の担体からの切り出しおよび塩基部のアシル基の除去をアルカリ処理により行い、次いで酸処理を行って5'-水酸基の保護基を除去する。これに続く逆相およびイオン交換クロマトグラフィー（高速液体クロマトグラフィーを含む）等の各種クロマトグラフィー等、通常の核酸精製に用いられる精製操作で精製することにより、DNA鎖を得ることができる。得られたDNAのヌクレオチド配列の確認は、例えばマキサム・ギルバートの化学修飾法 [Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) Methods in Enzymology 65, 499-559 参照] やM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法 [Messing, J. and Vieira, J. (1982) Gene 19, 269-276参照] により行うことができる。

【0034】かくして得られたオリゴデオキシリボヌクレオチドのセンス鎖とアンチセンス鎖とをアニーリングさせて二本鎖とし、DNAリガーゼを用いて細胞内で作用するプロモーターの支配下に該二本鎖DNAを連結することにより、本発明のリボザイムに転写されるDNAを構築することができる。

【0035】本発明のリボザイムは、例えばT7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列の下流に、上記のごとくして得られた本発明のリボザイムに転写されるDNAを連結したものに、ATP、CTP、GTPおよびUTPの存在下でT7 RNAポリメラーゼを作用させることにより得ることができる [Milligan, J. F., et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15, 8783-8798 参照]。その他、T3 RNAポリメラーゼやSP6 RNAポリメラーゼ等、他の既知のRNAポリメラーゼおよびプロモーター配列の組み合わせを利用することもできる。

【0036】さらに、本発明のリボザイムに転写されるヌクレオチド配列を含むDNAを含む発現ベクターを宿主細胞へ導入することにより、本発明の宿主細胞を得ることができ、また、同時に本発明の発現ベクターを産生することもできる。

【0037】上記(1)記載の複合体は、一般式(I)のαおよびβで示される2種のポリリボヌクレオチド鎖からなるが、このαおよびβをひとつの細胞で同時に発現させるためには、以下に記載するような方法を用いることができる。

【0038】二種類のベクターを導入する方法：α、β

に転写されるDNAが組み込まれた発現ベクターをそれぞれ別個に作製し、それら発現ベクターで宿主細胞をコ・トランスフェクションする。ベクター系は必要に応じて同一のもの、または異なるものをいずれも使用することができる。

【0039】ひとつのベクターに独立に組み込まれた遺伝子を発現させる方法：α、βに転写されるDNAがそれぞれ別のプロモーターの支配下に組み込まれた発現ベクターを作製し、宿主細胞内に導入する。プロモーターは必要に応じて同一のもの、または異なるものをいずれも使用することができる。

【0040】ひとつのベクターに連続に組み込まれた遺伝子を発現させる方法：ひとつのプロモーターの支配下にαおよびβに転写されるDNAが組み込まれた発現ベクターを作製し、宿主細胞内に導入する。ただしこの場合、αとβに一般式(I)に示されるような塩基対を形成させ、自己トリミング反応を生じさせるためには、αおよびβをコードする各DNAの間に、ある鎖長のポリヌクレオチドリンカーを介在させることが好ましい。該リンカーの長さは、例えば、

5'-α-(リンカー)-β-3'

のように各部位が配置される場合、好適には3~20ヌクレオチドであり、さらに3~8ヌクレオチドが好適である。また、

5'-β-(リンカー)-α-3'

のように連結される場合、リンカーの長さは好適には10~50ヌクレオチドであり、さらに20~40ヌクレオチドが好適である。これらリンカーの配列は、任意のものを用いることができるが、αまたはβとの間に塩基対を形成せず、一般式(I)に示されるような複合体構造の形成を阻害しない配列であることが好ましい。なお、本発明においては、自己トリミング反応によってαの3'末端側が切断された後のβは不要になるのであるから、βはαの3'末端側に配置されていることが好ましい。

【0041】宿主細胞およびベクターとしては以下のものが例示される。

【0042】原核細胞の宿主細胞としては、例えば大腸菌 (Escherichia coli) や枯草菌 (Bacillus subtilis) 等が挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質発現させるには、宿主細胞と適合し得る種由来のレプリコン、すなわち複製起点および調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞をトランスフェクトさせればよい。また、ベクターはトランスフェクトされた細胞に表現形質 (表現型) の選択性を付与することができる配列を持つものが好ましい。

【0043】例えば、大腸菌としては、E. coli K12株等がよく用いられ、ベクターとしては一般にpBR322やpUC系のプラスミドがよく用いられるが、本発明ではこれらに限定されず、公知の各種の菌株

およびベクターがいずれも利用できる。プロモーターとしては、大腸菌においてはトリプトファン (trp) プロモーター、ラクトース (lac) プロモーター、トリプトファン・ラクトース (tac) プロモーター、リボプロテイン (lpp) プロモーター、バクテリオファージ由来のラムダ (λ) PLプロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子 Tu (tufB) プロモーター等が挙げられ、いずれのプロモーターも本発明のリボザイムの産生に使用することができる。

【0044】また、枯草菌としては、例えば、207-25株が好ましく、ベクターとしては pTUB28 [Ohmura, K., et al. (1984) J. Biochem. 95, 87-93 参照] 等が用いられるが、本発明はこれらに限定されない。プロモーターとしては、枯草菌の α -アミラーゼ遺伝子の調節配列がよく用いられる。

【0045】真核生物の宿主細胞としては、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が利用可能であり、脊椎動物細胞としては、例えば、マウスの細胞である NIH-3T3 細胞 [(1969) J. Virol. 4, 549-553 参照]、サルの細胞である COS 細胞 [Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182 参照] やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 [Urbaniak, G. and Chasin, L. A., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220 参照] 等がよく用いられているが、本発明は、これらに限定されない。脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の upstream 位置するプロモーター、RNA のスプライシング部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これらはさらに必要に応じて複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40 初期プロモーターを有する pSV2dhfr [Subramani, S., et al. (1981) Mol. Cell. Biol. 1, 854-864 参照] や SV40 初期プロモーターに HTLV-I LTR の R-U5 連結した SR α プロモーターを有する pCDL-SR α [Takebe, Y., et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 466-472 参照] 等を例示できるが、本発明はこれらに限定されない。また、真核微生物としては酵母も使用し得る。該酵母等の真核微生物の発現ベクターとしては、例えば、アルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター [Bennetzen, J. and Hall, B. D. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3018-3025 参照] や酸性ホスファターゼ遺伝子のプロモーター [Miyahara, A., et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1-5 参照] 等を使用できる。

【0046】このようにして得られたベクターを導入することにより、他の原核生物または真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

【0047】宿主細胞として大腸菌を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、pBR322 複製起点を有し、大腸菌において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、翻訳開始シグナルを備えたものを用いることができる。該発現ベクターは塩化カルシウム法 [Mandel, M. and Higa, A. (1970) J. Mol. Biol. 53, 154 参照]、ハナハン法 [Hanahan, D. and Meselson, M. (1980) Gene 10, 63 参照] および電気穿孔法 [Neumann, E., et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845 参照] 等により大腸菌に取り込ませることができ、かくして所望のベクターがトランスフェクトされた細胞を得ることができる。

【0048】また、COS 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40 複製起点を有し、COS 細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよび RNA スプライス部位を備えたものを用いることができる。該発現ベクターは DEAE-デキストラン法 [Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1295-1308 参照]、リン酸カルシウム-DNA 共沈殿法 [Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) Virology 52, 456-457 参照] および電気穿孔法 [Neumann, E., et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845 参照] 等により COS 細胞に取り込ませることができ、かくして所望のベクターがトランスフェクトされた細胞を得ることができる。

【0049】また、宿主細胞として CHO 細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418 耐性マーカーとして機能する neo 遺伝子を発現し得るベクター、例えば pRSVneo [Sambrook, J., et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY 参照] や pSV2-neo [Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341 参照] 等によって共形質転換し、G418 耐性のコロニーを選択することにより本発明のリボザイムを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

【0050】上記のごとくして得られた形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内に本発明のリボザイムが産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものが適宜選択でき、例えば、大腸菌であればトリプトン-イースト培地 (バクトトリプトン 1.6 %, イーストエキストラクト 1.0 %, NaCl 0.5 % (pH 7.0)) やペプトン培地 (ディフコ社) 等を使用できる。

【0051】また、例えば COS 細胞であれば、RPMI-1640 培地やダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 等の培地に、必要に応じてウシ胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したものを使用することができる。

【0052】本発明のリボザイムは、塩の形で使用することができる。そのような塩としては、例えばナトリウム、カリウムのようなアルカリ金属；カルシウムのようなアルカリ土類金属；アンモニア；リジン、アルギニンのような塩基性アミノ酸；トリエチルアミンのようなアルキルアミン類；などの無機塩または有機塩を挙げることができる。

【0053】本発明のリボザイムが基質ポリリボヌクレオチド鎖を切断する活性を有していることは、例えば以下に記載する実験によって確認することができる。

【0054】まず、基質ポリリボヌクレオチドに対し、二価の金属イオンを含有する緩衝液中にて本発明のリボザイムを加え加温する。二価の金属イオンとしては、好適には Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 等が用いられる。緩衝液としては、中性からアルカリ性で使用される緩衝液であれば制限はないが、トリス-塩酸緩衝液、グリシルーグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液等が使用され得る。

【0055】反応温度は、0～100℃が好適であり、さらに30～50℃が好適である。

【0056】一定時間後、反応液中にエチレンジアミン四酢酸（以下「EDTA」という）を加えることにより反応を停止させる。

【0057】本発明のリボザイムによる基質ポリリボヌクレオチド鎖の切断の定量には、ポリリボヌクレオチドの5'末端をラジオアイソトープ等で標識し、切断産物をイメージアナライザー等で定量する方法、切断産物を逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で定量する方法などが用いられる。

【0058】また、本発明のリボザイムの自己トリミング反応についても、上記と同様の実験を行なうことにより確認することができる。

【0059】本発明のリボザイムは、動物や植物、または人体に薬理上使用できる担体と共に直接投与することが可能である。それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、または、注射剤、点滴剤、坐薬等による非経口投与を挙げることができる。

【0060】また、本発明のリボザイムに転写されるDNAを含む発現ベクターはリボソーム等の運搬体中に封入し投与することも可能である。そのようなリボソームとして、N-[1-(2,3-ジオレイロキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウム・クロリド（N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride；DOTMA）とジオレオイルホスファチジル・エタノールアミン（dioleoylphosphatidyl ethanolamine；DOP E）からなる「リボフェクチン（ギブコ・ビーアールエル社製）」やリボポリアミン【Behr, J. P., et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6986参

照】等が例示できるが、これらに限定されない。

【0061】その投与量は、症状、年齢、体重等によって異なるが、通常、経口投与では、成人に対して、1日約0.1mgないし1000mgであり、これらを1回、または数回に分けて投与することができる。また、非経口投与では、1回0.1mgないし1000mgを皮下注射、筋肉注射、または静脈注射によって投与することができる。

【0062】また、本発明のDNAを好適なベクターに組み込み、該ベクター自体を生体に投与することにより、細胞内でリボザイムを発現せしめ本発明の効果をすることも可能である。そのようなベクターとして、レトロウイルス（Moloney murine leukemic virus [Eglitis, N. A. and Anderson, W. F. (1988) Biotechniques 6, 608-614参照]等）、アデノウイルス【鍾江裕美ら、実験医学（1994）12, 316-322】、アデノアソシエトウイルス【平井幸彦、島田隆、実験医学（1994）12, 323-327】やワクシニアウイルス等が例示できるが、これらに限定されない。

【0063】さらに、植物・動物やヒトの生体より細胞を摘出し、該細胞に本発明の発現ベクターをトランスフェクトして培養し、細胞内に本発明のリボザイムを産生する能力を付与した後に、このトランスフェクトされた細胞を元の生体に移植して、特定のポリリボヌクレオチドに対する耐性を該生体にもたすことも可能である。この方法を利用することにより、例えば、ヒト生体を、エイズ等の特定の疾患に関連するポリリボヌクレオチドや、癌遺伝子に関連するポリリボヌクレオチドに対して耐性にしたり、脳疾患や重症心不全などに関連する誘導型一酸化窒素合成酵素（inducible NO synthase；以下「iNOS」という）を抑制することが可能である。

【0064】

【実施例】以下、実施例および参考例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

【0065】実施例1. オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成

ヒト神経膠腫（グリオーマ）細胞のiNOSをコードするmRNAのヌクレオチド配列を有する基質ポリリボヌクレオチドを切断するリボザイム配列を有し、かつ自己トリミング反応を生じるポリリボヌクレオチド（1）

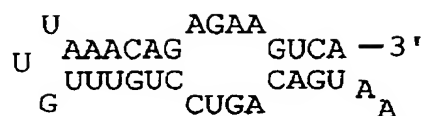
（配列表の配列番号2）および、iNOSのmRNAのヌクレオチド配列を有する基質ポリリボヌクレオチドを切断するリボザイム配列を有するが、自己トリミング反応は生じないポリリボヌクレオチド（2）（配列表の配列番号3）は、それぞれ以下のような構造を有する。

【0066】

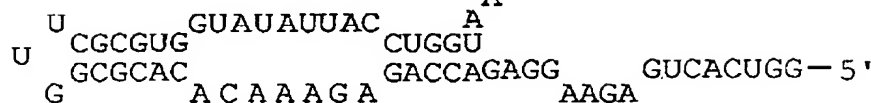
【化14】

27

28



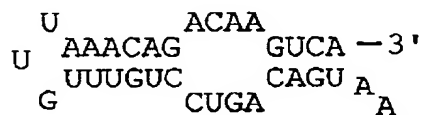
(1)



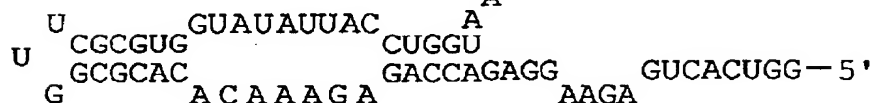
10

【0067】

【化15】



(2)



【0068】ポリリボヌクレオチド(1)をDNAからの転写反応によって得るため、鋳型DNA1(配列表の配列番号1)を調製した。まず、以下に記載するオリゴデオキシリボヌクレオチド:

5'- GTTAATACGA CTCACATATAG GTCAGTGA AGGAGACCA -3' (U1; 配列表の配列番号4)

5'- TGACTTCTCT GTTAACAAA CAGGACTG -3' (L1; 配列表の配列番号5)

5'- CAGAAACACA CGCGGTTCGC GTGGTATA -3' (U2; 配列表の配列番号6)

5'- TTACCTGGTA AAAAATGACA GTCCTG -3' (U3; 配列表の配列番号7)

5'- TTGTGTAAC AGAGAAGTCA -3' (U4; 配列表の配列番号8)

5'- TCAITTTTITA CCAGGTAATA TACCAC -3' (L2; 配列表の配列番号9)

5'- GCGAACC CGG TGTGTTCTC TGCTCTC -3' (L3; 配列表の配列番号10)

5'- CTTCTCAGTC ACCTATAGTC AGTCGTATTA AC -3' (L4; 配列表の配列番号11)

を合成した。

【0069】また、ポリリボヌクレオチド(1)の変異体であるポリリボヌクレオチド(2)の鋳型DNA2(配列表の配列番号14)を調製するために、U4、L1の代わりとして以下に記載するオリゴデオキシリボヌクレオチド:

5'- TTTGTGTAAC AGACAAGTCA -3' (U4-2; 配列表の配列番号12)

5'- TGACTTGTCT GTTAAACAAA CAGGACTG -3' (L1-

2; 配列表の配列番号13)

を合成した。

【0070】上記の各オリゴデオキシリボヌクレオチドは、デオキシヌクレオシド3'-ホスホロアミダイト

(株)パーキンエルマージャパン・アプライドバイオシステムズ事業部より購入)を原料として、DNA自動合成機(モデル394A; (株)パーキンエルマージャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製)で、1μmolスケールで合成した。

【0071】合成終了後、濃アンモニア水でCPG(Controlled Pore Glass)よりオリゴデオキシリボヌクレオチドを切り出し、60℃で5時間加温した。溶媒を留去し、脱イオン水に溶解した後、C18シリカゲル(ウォーターズ社製)カラムクロマトグラフィーを行なった(カラムサイズ1.5×12cm:5-40%アセトニトリル、0.1M トリエチルアンモニウムアセテート(Triethylammoniumacetate; 以下「TEAA」という)水溶液の溶媒を用いた直線濃度勾配により溶出)。約30%濃度のアセトニトリルで溶出されるジメトキシトリチルの発色を有するフラクションを集め、2mlの80%酢酸水溶液を加え、1時間攪拌した。酢酸を減圧下留去し、水層を酢酸エチルで洗浄した。溶媒を留去後、滅菌水1mlに溶解した。この画分中のポリリボヌクレオチドを逆相HPLCで分取後、さらにイオン交換HPLCで分取し、精製した。逆相HPLCの条件は以下の通りであった:

カラム: μ-ボンダパック(C-18)カラム
φ7.8×300mm(ウォーターズ社製)

溶媒: A溶液 5% アセトニトリル/0.1M TE

AA (pH7.0) ;

B溶液 25% アセトニトリル/0.1M TEAA
(pH7.0)。

【0072】各オリゴデオキシリボヌクレオチドについて
逆相HPLC

ての逆相HPLCにおける直線濃度勾配の条件および保持時間を表1に示す。

【0073】

【表1】

ヌクレ オチド	B%	直線濃度勾配 の全時間	保持時間
U2	30→50%	20分	11.8分
U3	30→50%	20分	15分
U4	25→45%	20分	17.1分
L1	30→50%	20分	11分
L2	30→50%	20分	15分
L3	30→50%	20分	15.2分
L4	30→50%	20分	16.8分
U4-2	25→45%	20分	18.0分
L1-2	30→50%	20分	11.6分

イオン交換HPLCの条件は以下の通りであった。

【0074】

カラム: TSKゲル DEAE 2SW

φ4.6×250mm (東ソー(株)社製)

溶媒: A溶液 20% アセトニトリル/水;

B溶液 20% アセトニトリルを含む2M 酢酸アン
イオン交換HPLC

20 モニウム水溶液。

各オリゴデオキシリボヌクレオチドについてのHPLC
における直線濃度勾配の条件および保持時間を表2に示
す。

【0075】

【表2】

ヌクレ オチド	B%	直線濃度勾配 の全時間	保持時間
U2	30→50%	20分	15.1分
U3	30→50%	20分	18.4分
U4	25→45%	20分	15.3分
L1	30→50%	20分	18.7分
L2	30→50%	20分	18分
L3	35→55%	20分	9.7分
L4	35→55%	20分	13.5分
U4-2	30→50%	20分	14.0分
L1-2	30→50%	20分	15.7分

実施例2. 鋳型DNAの調製

鋳型DNA1 (配列表の配列番号1) を構築するため、
まず実施例1で調製したオリゴデオキシリボヌクレオチ
ドU2の5'末端をリン酸化した。5μlのU2溶液
(1nmol分)、2μlの5倍濃度キナーゼ反応用緩
衝液(250mMトリス-塩酸(pH7.6)、50m
M 塩化マグネシウム、50mM 2-メルカプトエタ
ノール)、2μlの10mM ATPおよび1μlのT
4ポリヌクレオチドキナーゼ(1単位; 宝酒造(株)社
製)を混合した溶液を37℃で1時間保温することによ

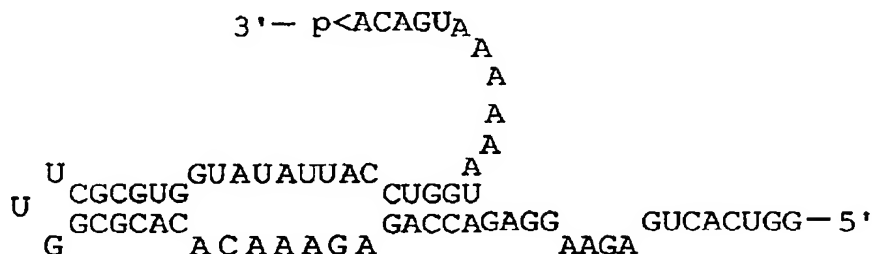
り、U2の5'末端をリン酸化した。以後、例えばリン
酸化されたU2を「pU2」と表記する。同様にしてU
3、U4、L2、L3およびL4の5'末端をリン酸化
することにより、pU3、pU4、pL2、pL3およ
びpL4を調製した。

【0076】U1とpL4を「ブロック1」、pU2と
pL3を「ブロック2」、pU3とpL2を「ブロック
3」、およびpU4とL1を「ブロック4」とし(図
1)、それぞれのブロック(オリゴデオキシリボヌクレ
オチド各1nmol)を35μlの蒸留水に溶解し、5

倍濃度リガーゼ反応緩衝液 (330 mM トリシュー塩酸 (pH 7.6)、33 mM 塩化マグネシウム) 10 μ l を加えて、90°C で3分間加温後急冷することにより変性させた。再び70°C で10分間加温した後室温まで徐冷した。

【0077】ブロック1とブロック2の入った溶液をあわせて、全量を90 μ lとし、50℃で5分間加熱後、室温まで徐冷した。このものを氷冷下で10分間放置し、蒸留水3 μ l、10mM ATP 2.5 μ l、0.2M 2-メルカプトエタノール 5 μ l、T4 DNAリガーゼ(350単位/ μ l;宝酒造(株)社製) 2 μ lを加え16℃で12時間保温した。この反応液にエタノール沈殿操作を行なって沈殿を回収し、10%ボリアクリルアミドゲル電気泳動(100V定電圧、3時間)により分画した。電気泳動終了後、ゲルを臭化エチジウムで染色し、トランスイルミネーター(366nm)上で反応生成物(ブロック1とブロック2の連結物(67塩基対))のバンドに相当する部分を切り出した。ゲル片と滅菌水約400 μ lを半透膜チューブ(スベクトラポア、排除限界分子量12000~14000、スペクトラム・メディカル・インダストリーズ社製)に入れ、90mM トリス-塩酸、90mM ほう酸、4mM EDTAを含む緩衝液の入ったサブマリン型電気泳動槽に浮かべ、電圧をかけて(100V、約30分)ゲル片より目的のDNAフラグメントを溶出させた。その後透析チューブ内液についてエタノール沈殿操作を行ない、沈殿をブロック1とブロック2の連結物として回収した。ブロック3とブロック4の組み合わせでも同様の操作を行って、連結物(46塩基対)を得た。同様にブロック1とブロック2の連結物と、ブロック3とブロック4の連結物とを連結することにより、鑄型DNA1(113塩基対)を得た。

【0078】また、上記と同様にしてポリリボヌクレオチド2をコードする鋳型DNA2（113塩基対）を調製した。ただし、U4、L1の代わりにU4-2、L1-2を用いた。



(3)

【0084】およびポリリボヌクレオチド(2)を、以下に記載する方法に従って精製した。まず鋳型DNA 1 (1 pmol, 0.4 μ l)、10倍濃度T7RNAポリメラーゼ反応緩衝液(アンブリスクライブ社製) 2 μ l、100mM ATP、100mM CTP、100mM GTPおよび100mM UTP 各1.5 μ l

【0079】実施例3. 鋳型DNAからポリリボヌク
レオチドへの転写反応

実施例 2 で調製した鑄型 DNA 1 を用いて、以下に記載する転写反応によって目的のポリリボヌクレオチド

(1) を得た。

【0080】0.4 μ lの鋳型DNA1溶液(0.5 p mol相当)、10倍濃度T7RNAポリメラーゼ緩衝液(400mM トリスー塩酸(pH7.5)、120mM塩化マグネシウム、20mM スペルミジン三塩酸塩)2 μ l、100mMATP、100mM CTP、100mM GTPおよび100mM UTP各1.5 μ l、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP 2 μ l、100mM ジチオスレイトール(以下「DTT」という)2 μ l、滅菌水7.6 μ l、T7RNAポリメラーゼ(1単位、宝酒造(株)社製)2 μ lを混合し、37℃で2時間保温した。反応混合物を8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(1000V定電圧、2時間)に供し、泳動後のゲルのオートラジオグラフィーを行なった結果、大きさの異なる2種類のRNAが生成していた(図2のレーン2)ことから、自己トリミング反応が生じたことが示された。

【0081】同様にして鋳型DNA 2を用い、転写反応および電気泳動を実施した結果、上記鋳型DNA 1からの転写産物のうち分子量の大きい方のバンドと同じ大きさのバンドのみが検出された(図2のレーン1)ことから、自己トリミング反応は生じなかったことが示された。

【0082】実施例4. ポリリボヌクレオチド(1)
の自己トリミング反応によって生じた5'側の切断断片
(ポリリボヌクレオチド(3)およびポリリボヌクレオ
チド(2)の単離

ポリリボヌクレオチド (1) の自己トリミング反応によって生じた 5' 側の切断断片、すなわち以下に記載するポリリボヌクレオチド (3) :

【 0 0 8 3 】

【化 1 6】

1、100mM DTT 2 μ l、蒸留水 7、6 μ l、T7 RNAポリメラーゼ（アンブリスクライブ社製、2 μ l）を加え全量20 μ lで37℃で2時間保温した。その後デオキシリボヌクレアーゼI（1単位/ μ l；アンブリスクライブ社製）1 μ lを加え37℃で15分間保温した。この反応液についてフェノール抽出を

行い、水層を回収してさらにフェノール・クロロホルム抽出した後、再び水層を回収してエタノール沈殿操作を行い、沈殿を回収した。沈殿にリボザイムの切断反応用緩衝液(40mM トリス塩酸、12mM 塩化マグネシウム、2mM スペルミジン三塩酸塩)12.5 μ lを加え37℃で1時間保温することにより、十分に自己トリミング反応をさせた後、ローディング溶液(10M尿素、50mM EDTA)5 μ lを加え、6%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(500V定電圧、3時間)を行なった。

【0085】泳動終了後のゲルに260nmの紫外線を照射することによりRNAのバンドを可視化し、目的のバンドに相当するゲル片を切り出した。ゲル片を200 μ lの滅菌水中に入れ、室温で1時間振盪することによりRNAを抽出した後、抽出液を回収した。残ったゲル片に新たに200 μ lの滅菌水を加え、同様の操作を繰り返すことにより、合計400 μ lの抽出液を得た。核酸精製用カラム(NENSORB 20;デュボン社製)に2mlのエタノールおよび2mlの洗浄用緩衝液(0.1M トリス塩酸(pH7.7)、10mM トリエチルアミン、1mMEDTA)を流して平衡化した後、さらに2mlの洗浄用緩衝液を加え、そこに上記で得られたゲル抽出液を加えて混合した。次いで、カラムに1mlの洗浄用緩衝液および3mlの滅菌水を流して洗浄した後、600 μ lの10% n-ブタノールを流すことによりRNAを溶出させ、溶出液を回収した。この溶出液中の溶媒を減圧下で留去し、残渣を50 μ lの滅菌水に溶解したものをポリリボヌクレオチド(3)試料とした。ポリリボヌクレオチド(2)の単離も同様にして行なった。ただし、自己トリミング反応は生じないので、切断反応用緩衝液で37℃で1時間保温する操作は省略した。

【0086】参考例1. 基質オリゴリボヌクレオチド(4)の合成および標識

iNOS mRNAの部分ヌクレオチド配列を有するオリゴリボヌクレオチド(4) ([Hokari, A., et al. (1994) J. Biochem. 116, 575-581参照] 記載のヌクレオチド番号114から132までの19量体)を、以下に記載する方法で調製した。塩基部のアミノ基がアシル基で、5'-水酸基がジメトキシトリチル基で、2'-水酸基がtert-ブチルジメチルシリル基でそれぞれ保護された、4種のリボヌクレオチド3'-ホスホロアミダイト(グレンリサーチ社製)を原料として、DNA/RNA自動合成機(モデル394A; (株)パーキンエルマー・ジャパン社アブライド・バイオシステムズ事業部製)で以下のヌクレオチド配列:
5'-GCCACCUCCA GUCCAGUGA -3' (配列表の配列番号15)

を有するオリゴリボヌクレオチドを1 μ molスケールで合成した。合成終了後、オリゴヌクレオチドが結合し

たCPG(Controlled Pore Glass)に濃アンモニア水:エタノール(3:1(v/v))混液を加えて室温で2時間放置し、さらに55℃で16時間加熱した。溶媒を留去し、残渣に1mlの1M テトラブチルアンモニウムフルオリド(TBAF)/テトラヒドロフラン

(THF)溶液を加え、37℃で16時間攪拌した。これに5mlの0.1M TEAA(pH7.0)を加えた後、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行なった(カラムサイズ ϕ 1.5 \times 12cm(ウオーターズ社製):5-40% アセトニトリル、50mM トリエチルアンモニウム・バイカーボネート水溶液の溶媒を用いた濃度勾配により溶出)。約30%濃度のアセトニトリルで溶出されるジメトキシトリチルの発色を有するフラクションを集め、5mlの0.01N 塩酸を加え、1時間攪拌した。0.1N アンモニア水を加えて中和後、水層を酢酸エチルで洗浄し、溶媒留去後滅菌水1mlに溶解した。この画分中のポリリボヌクレオチドを逆相HPLCで分取後、さらにイオン交換HPLCで分取し、精製した。逆相HPLCは μ -ボンドスフェア(C-18)カラム(ϕ 3.9 \times 150mm、ウオーターズ社製)を用い、A溶液として5% アセトニトリルを含む0.1M TEAA、pH7.0)、B溶液として25% アセトニトリルを含む0.1M TEAA(pH7.0)を用い、直線濃度勾配法により行なった(B%30 \rightarrow 50%(20分))。オリゴリボヌクレオチド(4)は8.4分に溶出された。イオン交換HPLCは、TSKゲル DEAE 2SW(ϕ 4.6 \times 250mm、東ソー(株)社製)カラムを用い、A溶液として20% アセトニトリル/水、B溶液として20% アセトニトリルを含む2M 酢酸アンモニウム水溶液を用い直線濃度勾配法により行なった(B%:25 \rightarrow 45%(20分))。オリゴリボヌクレオチド(4)は14分に溶出された。得られたオリゴリボヌクレオチド(4)は、ヘアピン型リボザイムの切断反応の基質として後述の実験に供した。

【0087】上記のごとく調製したオリゴリボヌクレオチド(4)(200pmol)に[γ -³²P]ATP(10 μ Ci)1 μ l、5'末端標識反応用緩衝液(250mM トリス塩酸(pH7.6)、50mM 塩化マグネシウム、50mM 2-メルカプトエタノール)4 μ l、A-19株由来T4ポリリボヌクレオチドキナーゼ(1単位;宝酒造(株)社製)1 μ l、滅菌水14 μ lを加え、37℃で1時間保温することによりオリゴリボヌクレオチド(4)の5'末端を標識した。反応液を20%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(1000V定電圧、2時間)に供し、泳動後のゲルのオートラジオグラフィーを行った後、現像されたX線フィルムで目的のバンドの位置を確認し、該バンド部分のゲル片を切り出した。以下、実施例4に記載した方法でRNAの抽出および精製を行い、5'標識オリゴヌクレ

オチドを得た。

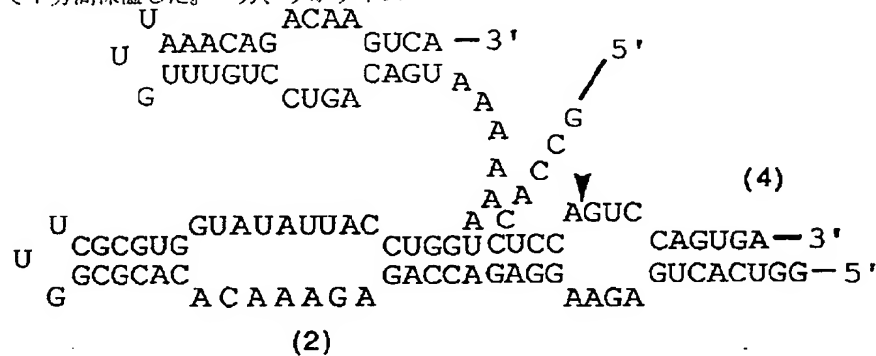
【0088】実施例5. リボザイム活性の確認

参考例1で調製した、5'末端標識した基質オリゴリボヌクレオチド(4)を40~200nMの範囲になるように切断反応緩衝液(40mM トリス-塩酸(pH 7.5)、12mM 塩化マグネシウム、2mM スペルミジン三塩酸塩)に溶解し、65℃で2分間加熱後氷冷した後、37℃で7分間保温した。一方、リボザイム

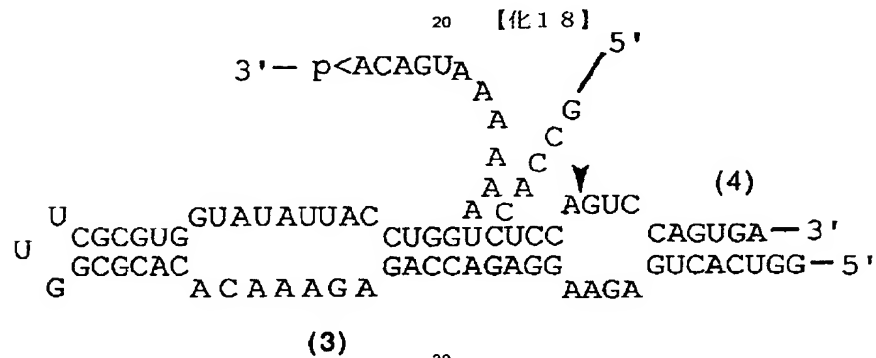
側のポリリボヌクレオチド(2)または(3)(1.0pmol)を100μlの切断反応緩衝液に溶解し、そのうち7μlを上記基質オリゴリボヌクレオチド(4)溶液(7μl)に加え反応を開始させた。それぞれの反応様式を以下に示す。

【0089】

【化17】



【0090】



【0091】この反応液を37℃で加温しながら、一定時間毎にサンプリングした反応液を、50mM EDTAおよび10M 尿素を含む溶液(5μl)に加え反応を停止させた。得られた各試料を、8M 尿素を含む20%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動することにより、反応生成物と未反応物を分離した。電気泳動後のゲルを、バイオイメージアナライザー(BAS2000; 富士写真フイルム(株)社製)を用いて分析した。すなわち、反応生成物と未反応物のアイソトープ活性を定量し、切断率を求め、また切断反応の初速度(切断率が1

0~20%のときの反応生成物量を反応時間で除した値)を算出した。次いで、各基質濃度での切断反応初速度を求め、Hanes - Woolf の式[大西正健(1988)酵素反応実験入門(学会出版センター刊)105-107 参照]に従い、酵素活性の指標となるKm値とkcat値を算出した。表3に各リボザイムのKmならびにkcat値を示す。

【0092】

【表3】

ポリリボ ヌクレオチド	Km (nM)	kcat (min ⁻¹)	kcat/Km (min ⁻¹ /nM ⁻¹)
(2)	66	0.19	2.80
(3)	31	0.25	8.0

kcatは反応速度の大きさを、Kmは基質に対する親和性をそれぞれ表わす数値であり、kcatが大きくK

mが小さいほど活性が強いことになるので、ポリリボヌクレオチド(1)の自己トリミングによって生じたポリ

リボヌクレオチド(3)は、自己トリミングを生じなかったポリリボヌクレオチド(2)よりも基質オリゴリボヌクレオチド(4)を切断する活性が強いことが示された。

【0093】実施例6. ポリリボヌクレオチド(1)をコードするDNAを含むプラスミドpUTRizの調製

鑄型DNA1をプラスミドベクターに組み込むために、この鑄型DNA1の両末端にEcoRI、およびBamHI制限酵素切断部位を付与するためのポリメラーゼ連鎖反応(以下「PCR」という)を行なった。まず、以下に記載する配列のオリゴデオキシリボヌクレオチド:

5'-CGGCGAATTC TTAATACGAC TCACTATA -3' (UP1; 配列表の配列番号16)

5'-GCACCGATCC TGACTTCTCT GTTAAACA -3' (LP1; 配列表の配列番号17)

をそれぞれ合成した。UP1およびLP1各10pmol、鑄型DNA1 0.3ng、10倍濃度Pfuポリメラーゼ用緩衝液(ストラタジーン社製)10μl、2.5mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTPの混合溶液4μl、Pfuポリメラーゼ(ストラタジーン社製)1μlを混合し、蒸留水を加えて合計100μlとしてから、1サイクルにつき95℃・1分、50℃・1分、72℃・2分で30サイクルのPCRを4回行ない、最後に、72℃10分間保温した。反応液をフェノール抽出し、水層を回収してフェノール・クロロホルム抽出を行った後、水層を回収してエタノール沈殿操作を行い、沈殿を回収した。この沈殿を2% アガロースゲル電気泳動(100V、1時間。ゲルの組成はニューシーブ・アガロース(エフエムシー社製):アガロース(ビーアールエル社製)=3:1(w/w)、0.5μg/ml 臭化エチジウム)し、泳動後のゲルをトランスイルミネーター(366nm)上に置いて目的のDNA(132塩基対)に相当するバンドのゲル片を切り出した。このゲル片と滅菌水約400μlを半透膜チューブ(スペクトラポア、排除限界分子量12000~14000、スペクトラム・メディカル・インダストリーズ社製)に入れ、90mM トリス塩酸、90mM ほう酸、4mM EDTAを含む緩衝液の入ったサブマリン型電気泳動槽に浮かべ、電圧をかけて(100V、約30分)ゲル片より目的のDNAフラグメントを溶出させた。この溶出液に対してエタノール沈殿操作を行って、沈殿を回収し、DNAフラグメント(132塩基対)を得た。

【0094】得られたDNAフラグメント(132塩基対)1μg(15.5μlの滅菌水に溶解したもの)に、10倍濃度の制限酵素反応用緩衝液K(宝酒造(株)社製)2μlおよびBamHI(宝酒造(株)社製、12単位)1μlを加えて37℃で3時間保温した後、4M 塩化ナトリウム 0.5μl、EcoRI

(宝酒造(株)社製、10単位)1μlを加え、37℃で一晩保温した。この反応液に対してフェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿操作を行い、回収した沈殿を上記と同様にしてアガロースゲル電気泳動し、制限酵素処理されたDNA断片(122塩基対)を精製した。

【0095】一方、プラスミドベクターpUC118(宝酒造(株)社製)1μg(3.51μl)、10倍濃度の制限酵素反応用緩衝液K 2μl、BamHI(宝酒造(株)社製、12単位)1μl、滅菌水 11.99μlを混合し(全量18.5μl)、37℃で3時間保温した後、4M 塩化ナトリウム 0.5μl、EcoRI(宝酒造(株)社製、10単位)1μlを加え37℃で一晩放置した。この反応液より、反応生成物をDNA精製キット(ウィザード・PCRプレップス・DNAピュリフィケーションシステム:プロメガ社製)を用いて精製した。

【0096】このようにして得られた、EcoRI、BamHI消化したpUC118および鑄型DNA1配列を有するDNA断片(122塩基対)各0.2μgを混合し、5倍濃度リガーゼ反応用緩衝液(330mM トリス塩酸(pH7.6)、33mM 塩化マグネシウム、2.5mM ATP)6μl、T4DNAリガーゼ(宝酒造(株)社製、350単位/ml)2μl、10mM ATP 5μl、蒸留水 7μlを加えて16℃で一晩保温した後、反応液のエタノール沈殿操作を行ない、沈殿を回収した。この沈殿(0.01μg相当)を大腸菌DH5α株のコンピテント細胞(ギブコ・ビーアールエル社製)に混合後、電気穿孔法遺伝子導入装置(ジーンバルサー;バイオラッド社製)を用いて、このベクターを導入した(電圧 2.5kV;キャパシタンス 25μF;抵抗 400Ω)。この大腸菌を100μg/ml アンピシリンを含むLB寒天培地(1% バクト・トリプトン(ディフコ社製)、0.5% イーストエキストラクト、0.5% 塩化ナトリウム、1.5%寒天)上で37℃で培養し、成育したコロニーの中から12コロニーを選択し、それぞれを100μg/ml アンピシリンの入った3mlのLB培地(1% バクト・トリプトン(ディフコ社製)、0.5% イーストエキストラクト、0.5% 塩化ナトリウム、pH7.5)中に接種して37℃で一晩培養した。

【0097】これらの各培養液1.5mlをエッペンドルフチューブに回収し、以下に記載する手順で少量のプラスミドを回収した[Molecular Cloning: A Laboratory Manual (second edition), Cold Spring Harbor Laboratory (1989) 1.25-1.28 参照]。まず培養液を遠心(4℃、5000rpm、3分間)して菌体を回収した後、100μlの第一液(50mM グルコース、25mM トリス塩酸(pH8.0)、10mM EDTA)に懸濁した。この懸濁液に200μlの第二液

(0.2N 水酸化ナトリウム、1% ラウリル硫酸ナトリウム)を加え室温で5分間放置することにより菌体を溶解した。このものに第三液(5M 酢酸カリウム 60ml、酢酸 11.5ml、蒸留水 28.5ml からなる溶液)を150 μ l加え、氷冷下で20分間放置した。この液を遠心分離(4℃、12000rpm、10分間)して、上清を別のエッペンドルフチューブに回収した。このものに10mg/mlのリボスクレアゼAを1 μ l加えて37℃で20分間保温した後、フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出を行ない、回収した水層に800 μ lのエタノールを加え、遠心分離した。沈殿を70%エタノールで洗ってから乾燥させた後、50 μ lのTE緩衝液(10mM トリス塩酸(pH8.0)、1mM EDTA)に溶解し、プラスミド試料とした。12個のコロニー由来のプラスミドを制限酵素KpnIでそれぞれ消化し、アガロースゲル電気泳動を行なった結果、12個のコロニーすべてがリボザイムの遺伝子を含むプラスミドを保持していることを確認した(pUC118にはKpnI切断部位が存在しているが、目的のプラスミドには存在しない)。12個のコロニーのうち6個を選択して100 μ g/mlアンピシリンを含む5mlのLB培地中で培養し、プラスミド精製用キット(キアゲン・ミディキット;キアゲン社製)によりプラスミドを回収精製した。

【0098】6個のコロニー由来のプラスミドについて、目的の遺伝子が挿入されていることを、市販のプライマーオリゴヌクレオチド(BcaBESTシーケンシングプライマーRV-Mまたは同M13-20;宝酒造(株)社製)をプライマーとして用い、DNAシーケンサー(モデル373A;(株)パーキンエルマージャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製)でヌクレオチド配列を解析した結果、いずれのプラスミドも配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含んでいることが確認された。そこで、1つのコロニーを選択して、大量培養を行なった。すなわち、目的のプラスミドを有する大腸菌を100 μ g/mlアンピシリンを含むLB培地 500mlに接種し、37℃で培養した。培養液を遠心分離して菌体を回収し、プラスミド大量精製用カラム(キアゲンチップ500;キアゲン社製)を該カラムに添付された説明書に従って使用することによりプラスミドを精製した。得られたプラスミドを50 μ

lのTE緩衝液に溶解して、約370 μ gのポリリボヌクレオチド(1)をコードするDNAをもつプラスミドpUTriRz試料とした。

【0099】実施例7. プラスミドpUTriRzから転写されて生成したポリリボヌクレオチドの自己トリミング反応

実施例6で調製したプラスミドpUTriRzを制限酵素HindIIIまたはSalIで消化したもの(0.2 μ g相当、5 μ l)に、5倍濃度T7RNAポリメラーゼ反応緩衝液(40mM トリス塩酸(pH7.5)、12mM塩化マグネシウム、2mM スペルミン三塩酸塩)4 μ l、10mM ATP、10mM CTP、10mM GTPおよび10mM UTP 各1 μ l、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP 1 μ l、T7RNAポリメラーゼ 2 μ l(アンブリスクライブ社製)、10mM DTT 1 μ l、リボスクレアゼインヒビター(25000単位/3460 μ l;宝酒造(株)社製)1 μ l、滅菌水4 μ lを加えて(合計20 μ l)、37℃で保温した。この反応液を8%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(1000V定電圧、2時間)に供し、泳動後のゲルのオートラジオグラフィーを行なった。

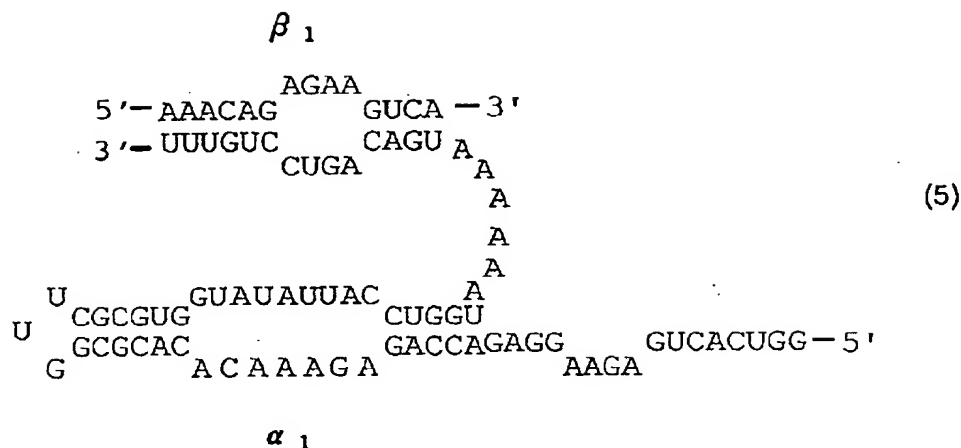
【0100】その結果、HindIIIで消化したpUTriRzを鋳型として用いたサンプルのレーン(図4のレーン1)には、自己トリミング反応による生成物のバンドが観察された。また、SalIで消化したpUTriRzを鋳型として用いたサンプルのレーン(図4のレーン2)にも、自己トリミング反応による同様の生成物のバンドが観察された。それらの生成物は、ポリリボヌクレオチド(1)から自己トリミング反応で生成したポリリボヌクレオチド(3)(図4のレーン3)と同じ移動度であることから、ベクター部分を含むプラスミドDNAから転写されて生成した長鎖のポリリボヌクレオチドにおいても、目的の部位で自己トリミング反応を起こし、その結果ポリリボヌクレオチド(3)と同じ長さのポリリボヌクレオチドが生成されることが示された。

【0101】実施例8. 自己トリミング型リボザイム複合体

前記一般式(I)において α と β が連結していないことを特徴とする本発明の複合体の例:

【0102】

【化19】



【0103】を構成するポリリボヌクレオチド:

5'-GGUCACUGAG AAGGAGACCA CAGAAACACA CGCGGUUCCG GU
CGUAUAUU ACCUGGUAAA AAAUGACAGU CCUGUUU-3' (α
1; 配列表の配列番号18)、および
5'-AAACAGAGAA GUCA-3' (β 1; 配列表の配列番号
19)

は、それぞれ以下に記載する方法に従って調製する。

【0104】塩基部のアミノ基がアシル基で、5'-水
酸基がジメトキシトリチル基で、2'-水酸基がtert-
ブチルジメチルシリル基でそれぞれ保護された、4種の
ヌクレオチド3'-ホスホロアミダイト(グレンリサ
ー社製)を原料として、DNA/RNA自動合成機(モ
デル394A; (株)パーキンエルマージャパン社アブ
ライド・バイオシステムズ事業部製)で配列表の配列番
号18または19に示されるヌクレオチド配列を有する
オリゴリボヌクレオチドを1 μ molスケールで合成す
る。

【0105】合成終了後、オリゴヌクレオチドが結合し
たCPG(Controlled Pore Glass)に濃アンモニア
水:エタノール(3:1(v/v))混液を加えて室温
で2時間放置し、さらに55℃で16時間加温する。溶
媒を留去し、残渣に1mlの1M テトラブチルアンモ
ニウムフルオリド(TBAF)/テトラヒドロフラン

(THF)溶液を加え、37℃で16時間攪拌する。こ
れに5mlの0.1M TEAA(pH7.0)を加え
た後、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行
なう(カラムサイズ ϕ 1.5×12cm(ウォーターズ
社製):5-40%アセトニトリル、50mM トリエ
チルアンモニウム・バイカーボネート水溶液の溶媒を用
いた濃度勾配により溶出)。約30%濃度のアセトニ
トリルで溶出されるジメトキシトリチルの発色を有するフ
ラクシオンを集め、5mlの0.01N 塩酸を加え、
1時間攪拌する。0.1N アンモニア水を加えて中和
後、水層を酢酸エチルで洗浄し、溶媒留去後滅菌水1m
lに溶解する。この画分中のポリリボヌクレオチドを逆
相HPLCで分取後、さらにイオン交換HPLCで分取

し、精製する。逆相HPLCは μ -ボンダスフェア(C-
18)カラム(ϕ 3.9×150mm、ウォーターズ
社製)を用い、アセトニトリルの直線濃度勾配法により
行なう。イオン交換HPLCは、TSKゲル DEAE
2SW(ϕ 4.6×250mm、東ソー(株)社製)
カラムを用い、アセトニトリルの直線濃度勾配法により
行なう。

【0106】かくして調製された α_1 および β_1 を混合
し、切断反応緩衝液(40mM トリス-塩酸(pH
7.5)、12mM 塩化マグネシウム、2mM スペ
ルミジン三塩酸塩)に溶解する。このものを65℃で2
分間加熱後水冷した後、37℃で7分間保温することに
より、 α_1 は配列表の配列番号18のヌクレオチド番号
68と69の間で β_1 によって切断されるので、実施例
3と同様にポリリボヌクレオチド(3)が生成する。

【0107】

【発明の効果】上記のごとく、本発明の自己トリミング
型リボザイムは、3'側の目的の部位で自己トリミング
反応を生じた。本発明の自己トリミング型ヘアピンリボ
ザイムは、一つの分子で3'側の自己切断(自己トリミ
ング)と、本来の標的RNAの切断を行うことができる
新規なリボザイムである。また、トリミングにより3'
側の不要部分が除去されたリボザイムの方が、3'側不
要部分が除去されていないリボザイムよりも切断活性が
高いことが示されたことから、本発明の自己トリミング
型リボザイムをコードするDNAは従来のものよりも優
れた効果を有する。本発明のリボザイム・ポリヌクレオ
チドをコードするDNAを好適なベクターに組み込み生体
内に投与することにより、生体に悪影響をもたらす天然
のポリリボヌクレオチドまたはRNAを特異的に切断す
ることが可能である。したがって、本発明により、従来
型のリボザイムよりもiNOSに由来する脳疾患や重症
心不全などに対し、高い治療ならびに予防効果が期待さ
れる。

【0108】

【配列表】

43

44

配列番号：1
配列の長さ：113
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
ハイボセティカル：No
アンチセンス：No

配列

GTTAATACGA CTCACTATAG GTCAGTGA AGGAGACCAG AGAAACACAC CGGTTGCGG 60
TCGTATATTA CCTGGTAAAA AATGACAGTC CTGTTTGTTA AACAGAGAAG TCA 113

配列番号：2
配列の長さ：94
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成RNA）
10 ハイボセティカル：No
アンチセンス：No

配列

GGUCACUGAG AAGGAGACCA GAGAAACACA CGCGGUCCG GUGGUAGUUAU ACCUGGUA 60
AAAUGACAGU CCUGUUGUU AAACAGAGAA GUCA 94

配列番号：3
配列の長さ：94
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成RNA）
ハイボセティカル：No
アンチセンス：No

配列

GGUCACUGAG AAGGAGACCA GAGAAACACA CGCGGUCCG GUGGUAGUUAU ACCUGGUA 60
AAAUGACAGU CCUGUUGUU AAACAGACAA GUCA 94

配列番号：4
配列の長さ：39
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
ハイボセティカル：No
アンチセンス：No

配列

GTTAATACGA CTCACTATAG GTCAGTGA AGGAGACCA 39

配列番号：5
配列の長さ：28
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
30 ハイボセティカル：No
アンチセンス：Yes

配列

TGACTTCTCT GTTAAACAAA CAGGACTG 28

配列番号：6
配列の長さ：28
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
ハイボセティカル：No
アンチセンス：No

配列

GAGAAACACA CGCGGTTGCG GTGGTATA 28

配列番号：7
配列の長さ：26
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

40 トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
ハイボセティカル：No
アンチセンス：No

配列

TTACCTGCTA AAAAATGACA GTCTCTG 26

配列番号：8
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
ハイボセティカル：No
アンチセンス：No

配列

45

TTTGTTAAAC AGAGAAGTCA

配列番号：9
配列の長さ：26
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

配列

TCATTITTTA CCAGGTAATA TACCAC

配列番号：10
配列の長さ：27
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

配列

CCGAACCGCG TGTGTTCCTC TGCTCTC

配列番号：11
配列の長さ：32
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

配列

CTTCTCAGTG ACCTATAGTG AGTCGTATTA AC

配列番号：12
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

配列

TTTGTTAAAC AGACAAGTCA

配列番号：13
配列の長さ：28
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

配列

TGACTTGICT GTTAAACAAA CAGGACTG

配列番号：14
配列の長さ：113
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖

配列

GTTAATACGA CTCCTATAG GTCCTGAGA AGGAGACCAG AGAAACACAC CGGTTTCGG 60
TGGTATATTA CCTGGTAAAA AATGACAGTC CTGTTTGTTA AACAGACAAG TCA 113

配列番号：15
配列の長さ：19
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

配列

GCCACCCCA GUCCACUGA

配列番号：16
配列の長さ：28
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

配列

CGCGAATTC TTAATACGAC TCACTATA

46

20

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
ハイボセティカル：No
アンチセンス：Yes

26

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
ハイボセティカル：No
アンチセンス：Yes

27

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
ハイボセティカル：No
アンチセンス：Yes

32

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
ハイボセティカル：No
アンチセンス：No

20

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
ハイボセティカル：No
アンチセンス：Yes

28

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
ハイボセティカル：No
アンチセンス：No

60

113

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成RNA）
ハイボセティカル：No
アンチセンス：No

19

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（合成DNA）
ハイボセティカル：No
アンチセンス：No

28

47

48

配列番号：17
配列の長さ：28
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

配列

GCACGGATCC TGACTTCTCT GTTAAACA

28

配列番号：18
配列の長さ：77
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

配列

GGUCACUGAG AAGGACACCA GAGAAACACA CGCGUUCGC GUGUAUAUU ACCUGGUAUU 60
AAAUGACAGU CUGUUU 77

配列番号：19
配列の長さ：14
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

配列

AAACAGAGAA GUCA

14

【図面の簡単な説明】

【図1】 鋳型DNAの構築図

【図2】 鋳型DNAから転写されたポリリボヌクレオチドの自己トリミング反応のオートラジオグラフィー

【図3】 ポリリボヌクレオチド(1)をコードするD

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

ハイボセティカル：No

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成RNA）

ハイボセティカル：No

10 アンチセンス：No

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成RNA）

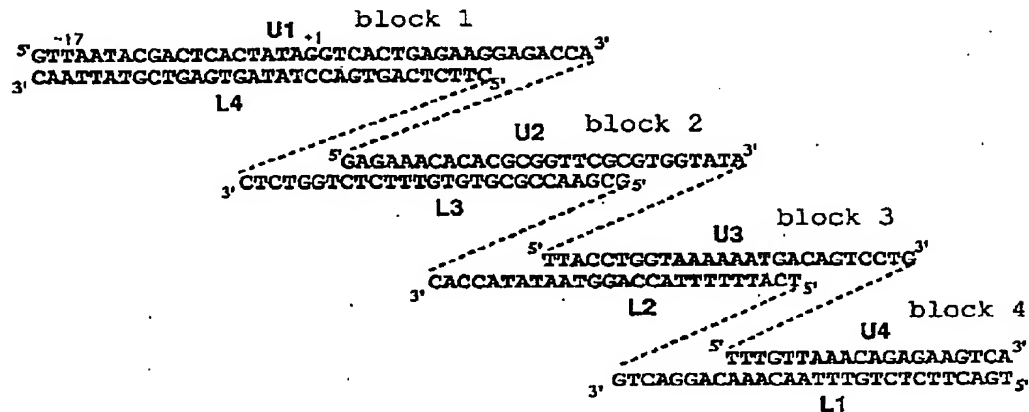
ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

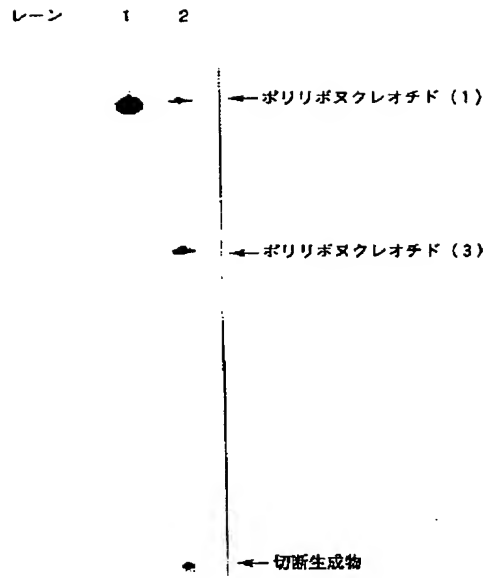
20 NAをもつプラスミドpUTriRzの構築図

【図4】 プラスミドpUTriRzから転写されたポリリボヌクレオチドの自己トリミング反応のオートラジオグラフィー

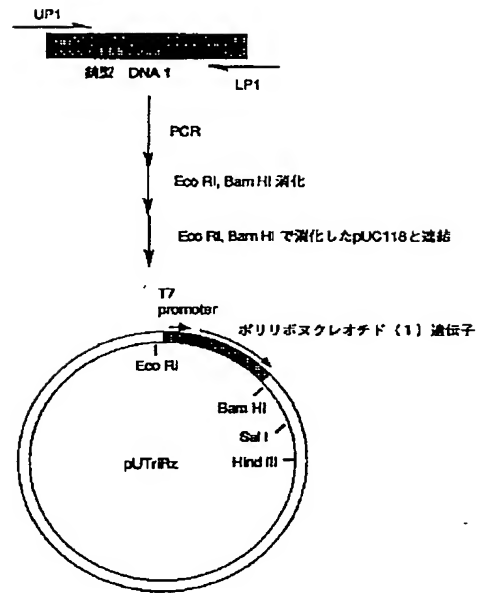
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

